3 月 March
2019, 62(3): 304 - 311

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.03.004

柑橘凤蝶细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 的生物学及重组蛋白表达特性

孙 娜, 丁伟峰, 刘志刚, 张 欣, 李 娴, 冯 颖*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 昆明 650233)

摘要:【目的】研究柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 细胞系 RIRI-PX1 的单细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 的生物学和重组蛋白表达特性。【方法】用野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(wild-type *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus, wt-AcMNPV)侵染 RIRI-PX1-C24 与 RIRI-PX1,检测细胞对野生型病毒的敏感性;使用重组绿色荧光蛋白杆状病毒(AcMNPV-GFP)、重组 β-半乳糖苷酶杆状病毒(AcMNPV-Gal)以及重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒(AcMNPV-SEAP)分别侵染细胞系 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1,在之后的 24, 48, 72, 96, 120, 144 和 168 h 检测 3 种重组蛋白的表达量;通过简单重复序列区间(inter simple sequence repeat, ISSR)标记比较 RIRI-PX1-C24 与 RIRI-PX1 的遗传相似性。【结果】亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 均能被 wt-AcMNPV 侵染,其中 RIRI-PX-C24 对 wt-AcMNPV 的敏感性较 RIRI-PX1 有显著提高。3 种重组蛋白均能在 2 个细胞系中表达,其中重组绿色荧光蛋白在 RIRI-PX1-C24 中的表达水平远高于在亲本细胞系 RIRI-PX1 中的表达水平,但重组 β-半乳糖苷酶蛋白和重组分泌型碱性磷酸酶蛋白在 RIRI-PX1-C24 中的表达水平较在 RIRI-PX1 中的无显著提高。用 10 条 ISSR 引物进行的 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1 2 个细胞系的指纹图谱分析中,4 条引物扩增条带在这 2 个细胞系间存在差异;2 个细胞系的遗传相似性范围在 0~83.33%之间,说明克隆株及其亲本细胞系在基因型上存在差异。【结论】通过对柑橘凤蝶细胞系 RIRI-PX1 进行单细胞克隆,确实获得了使重组绿色荧光蛋白表达水平有显著提高的克隆株 RIRI-PX1-C24,其利用价值仍需进一步的研究。

关键词: 柑橘凤蝶; 单细胞克隆; 重组杆状病毒; 重组蛋白; 简单重复序列区间

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)03-0304-08

Characterization and recombinant protein expression in the clonal strain RIRI-PX1-C24 derived from *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae)

SUN Na, DING Wei-Feng, LIU Zhi-Gang, ZHANG Xin, LI Xian, FENG Ying* (Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650233, China)

Abstract:【Aim】This study aims to explore the biological characteristics and the expression of recombinant proteins in the cell line RIRI-PX1-C24 cloned from RIRI-PX1 cell line derived from *Papilio xuthus*.【Methods】The wild-type *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus (wt-AcMNPV) was used to infect the clonal strain RIRI-PX1-C24 and the parent cell line RIRI-PX1, and the viral susceptibility of the two cell lines were detected. The recombinant baculoviruses carrying three reporter genes, *i.e.*, green fluorescent protein (GFP) gene, β-galactosidase (Gal) gene, and secreted

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2016ZD005)
作者简介: 孙娜, 女, 1993 年 12 月生, 安徽淮北人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫细胞工程, E-mail: sunna1993@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: rirify@139.com
收稿日期 Received: 2018-04-25; 接受日期 Accepted: 2018-12-20

alkaline phosphatase (SEAP) gene, were used to infect RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1. The expression levels of the three recombinant proteins between the two cell lines were detected at 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 h after viral infection. The genetic similarity between RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1 were compared by using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. 【Results】Both of the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24 could be infected by wt-AcMNPV, but RIRI-PX1-C24 was significantly more susceptible to wt-AcMNPV than RIRI-PX1. The recombinant GFP had significantly higher expression levels in RIRI-PX1-C24 than in RIRI-PX1. However, there were no significant differences in the expression levels of recombinant Gal protein and recombinant SEAP protein between RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1. The fingerprint analysis of RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1 using 10 ISSR primers generated four differential markers. The two cell lines had the genetic similarity levels ranging from 0 to 83.33%, indicating the difference in genotype. 【Conclusion】This study has produced the clonal strain RIRI-PX1-C24 from the parent cell line RIRI-PX1 of *P. xuthus* by single cell cloning, which has a significantly enhanced expression level of recombinant GFP. The application value of RIRI-PX1-C24 needs further research.

Key words: *Papilio xuthus*; single cell cloning; recombinant baculovirus; recombinant protein; inter simple sequence repeat (ISSR)

昆虫细胞系及其培养技术已被广泛应用于昆虫生理学、病理学及分子生物学等领域(张寰等, 2007)。其中,利用昆虫细胞作为生物反应器的杆状病毒表达载体系统(baculovirus expression vector system, BEVS)已被用于重组蛋白的体外表达,在生物学、农学以及医学领域发挥重要作用(Granados *et al*., 2007; Swiech *et al*., 2012)。目前,已报道的昆虫细胞系多数来源于鳞翅目(Lepidoptera)昆虫(Murhammer, 2016),特别是来源于鳞翅目夜蛾科的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 Sf9 和 Sf21 以及粉纹夜蛾 *Tricoplusia ni* 细胞系 BTI-Tn-5B1-4 等(Vaughn *et al*., 1977; Granados *et al*., 1994)是广泛用于 BEVS 的宿主细胞系。在这些细胞内表达的外源糖蛋白的糖链主要为三甘露糖(paucimannose)型,而不是类似哺乳动物体内的复杂的末端唾液酸化的 N-糖链(Jarvis and Finn, 1995; Marchal *et al*., 2001; Jarvis, 2003),因此在治疗性蛋白的生产方面 BEVS 应用很少(Durocher and Butler, 2009)。Palomares 等(2003)对黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 细胞系 DpN1 的糖基化研究发现, DpN1 表达的重组蛋白糖基化程度较 BTI-Tn5B1-4 更加完全,并认为它可以代替常见工程细胞系进行复杂糖基化蛋白的生产,这为开发具有新特性的 BEVS 提供了可能。

昆虫细胞系,特别是来源于新孵幼虫的细胞系,是通过将整个虫体剪碎离散后获得的组成多样的细胞增殖而来,其形态、大小、以及对病毒的敏感性都存在不同程度的差异(Pan *et al*., 2010)。单细胞克隆技术是纯化细胞系使其均一化的重要手段。通过单细胞克隆可以筛选出形态均一、对病毒敏感的细胞。细胞系 RIRI-PX1 来源于鳞翅目凤蝶科(Papilionidae)柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 新孵幼虫,其细胞类型组成多样,利用野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(wild-type *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus, wt-AcMNPV)侵染细胞发现,部分细胞表现出病理学特征并产生大量包涵体(Zhang *et al*., 2012)。本研究以亲本细胞系 RIRI-PX1 为对照,对 RIRI-PX1 的单细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 的生物学特性、对 AcMNPV 敏感性以及侵染后 3 种重组蛋白的表达水平进行了研究,并比较了 RIRI-PX1-C24 与亲本细胞系 RIRI-PX1 的遗传相似性,以期为其后续利用提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　供试细胞

柑橘凤蝶细胞系 RIRI-PX1 由中国林业科学研究院资源昆虫研究所建立并保存。单细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 是使用刘志刚等报道的方法(Liu *et al*., 2018),通过半固体培养法,结合 Eppendorf 显微操作系统从 RIRI-PX1 细胞系中挑取培养获得的。培养基为张欣等根据经典 Grace 昆虫培养基经过改良获得的 $Grace^{+}$ 培养基(Zhang *et al*., 2011, 2012),培养时添加 20% 的 HyClone 胎牛血清(货号

SV30087.02)以促进细胞生长。培养条件为 27℃ 避光恒温培养。

1.2 供试病毒

wt-AcMNPV 由江苏大学唐平博士馈赠。供试的 3 种重组杆状病毒分别是:重组绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)杆状病毒 AcMNPV-GFP、重组 β-半乳糖苷酶(β-galactosidase, Gal)杆状病毒 AcMNPV-Gal 以及重组分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)杆状病毒 AcMNPV-SEAP。AcMNPV-GFP 包含的 GFP 基因来自商业质粒产品 phMGFP Vector (Promega, 货号 E6421, GenBank 登录号: AY218848.1),扩增引物为 5′-GGCGAATTCATGGGCGTGATCAAGCCCGA-3′(下划线为酶切位点 *Eco*R Ⅰ)和 5′-GACAAGCTTAGCCGGCCTGGCGGGGTA-3′(下划线为酶切位点 *Hin*dⅢ)。AcMNPV-Gal 包含的 β-galactosidase 基因来自 pSV-β-Galactosidase Control Vector (Promega, 货号 E1081, GenBank 登录号: X65335),扩增引物为 5′-GGCGAATTCGTCGTTTTACAACGTCGTGA-3′(下划线为酶切位点 *Eco*R Ⅰ)和 5′-GACAAGCTTATTTTTGACACCAGACCA-3′(下划线为酶切位点 *Hin*dⅢ)。AcMNPV-SEAP 的 SEAP 基因来自 pSEAP2-Control Vector (Clontech, 货号 631717, GenBank 登录号: U89938),扩增引物为 5′-ATGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′ 和 5′-GGATCCTGTCTGCTCGAAGCGGCCGG-3′(下划线为酶切位点 *Bam*HI)。使用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统(Thermo Fisher Scientific Inc., 货号 10359-016)构建上述重组杆状病毒,并取 P2 代病毒贮备液用于试验。使用 BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit (Clontech Laboratories, Inc., 货号 631406)测定病毒滴度。

1.3 细胞对 wt-AcMNPV 敏感性的测定

取指数生长期的供试 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞稀释至密度为 3.25×10^5 个/mL,接种至 96 孔细胞培养板(Corning,货号 3524),每孔 200 μL 细胞悬液。每个细胞接种 4 孔,其中 3 孔作为平行处理,1 孔作为阴性对照。27℃ 孵育 1 h 使细胞贴壁,吸弃孔中的全部培养基。使用 BacPAK™ Baculovirus Rapid Titer Kit (Clontech,货号 631406)检测细胞中的 wt-AcMNPV 的感染量:将 wt-AcMNPV 稀释至 2.08×10^3 IFU/mL,并接种于上述 96 孔板,每孔接种 25 μL 病毒稀释液,室温孵育1 h;吸弃孔中病毒液,再加入 50 μL 甲基纤维素(methyl cellulose)覆盖细胞,于 27℃ 恒温避光培养 44 h;利用免疫学原理标记病毒包膜蛋白 GP64,染色后使用 Olympus IX71® 倒置生物显微镜对每孔中的蓝色斑点进行计数。

1.4 重组 GFP 在细胞中表达水平的测定

1.4.1 重组 GFP 表达水平检测:取指数生长期的供试 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞,稀释至密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔细胞培养板(Corning, 货号 3524),每孔 200 μL 细胞悬液。每个细胞系接种 4 孔,其中 3 孔接种 AcMNPV-GFP 作为平行处理,1 孔不接种病毒作为阴性对照。测定 AcMNPV-GFP 病毒滴度,计算并稀释病毒液,使每个细胞感染的病毒数达到 5(MOI = 5)。培养板置于摇床(杭州米欧仪器有限公司,型号 GS-20)以 60 r/min 的速率避光轻摇 2 h,使细胞充分吸收病毒;之后小心地将每孔中培养基全部吸出,注意避免吸起细胞。然后向每孔中补加 200 μL 新鲜培养基,置于 27℃ 恒温避光培养。24 h 后进行第 1 次检测,之后每隔 24 h 检测一次,共检测 7 次。使用 ImageXpress Micro XLS 宽场高内涵成像分析系统(Molecular Devices)对接种 AcMNPV-GFP 的 96 孔板进行扫描,统计每孔中发绿色荧光的细胞数。

1.4.2 Western blotting 检测:使用 AcMNPV-GFP 分别感染 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1 细胞。5 d 后收集细胞并用 PBS 清洗 2 遍以除去培养基。细胞裂解液(Thermo,货号 89802)裂解受侵染的供试细胞并于 4℃ 低温以 12 000 g 速率离心 10 min 获得上清裂解液,再与 6 × Protein Loading Buffer(北京全式金生物技术有限公司,货号 DL101-02)按照 5∶1(v/v)混合均匀后做 SDS-PAGE,其中胶浓度为 12%,电泳条件为 150 V 恒压 50 min。之后转 PVDF 膜做免疫印迹,其中一抗 ProteinFind Anti-GFP Mouse Monoclonal Antibody(全式金,货号 HT801-01,1∶1 500稀释),二抗 ProteinFind Goat Anti-Mouse IgG (H + L), HRP Conjugate(全式金,货号 HS201,1∶2 500稀释)。

1.5 重组 β-半乳糖苷酶蛋白在细胞中表达水平的测定

使用 24 孔板(Corning, 货号 3524)接种供试 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞,AcMNPV-Gal 接种方法与 1.4.1 节接种 AcMNPV-GFP 方法相同,3 孔接种 AcMNPV-Gal 作为平行处理,1 孔不接种病毒作为阴性对照。调节 AcMNPV-Gal 的 MOI 到 5。检测前再次以 60 r/min 的速率摇板 30 min,使细胞表达产物在培养基中分布均匀。每孔取 30 μL 培养基作为待测样品,并向原孔补加 30 μL 新鲜培养基。

使用 β-半乳糖苷酶 Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer（Promega Corporation，货号 E2000）检测样品中 β-半乳糖苷酶活性（mU）。使用 Varioskan Flash 多功能酶标仪（Thermo Fisher）检测吸光值。每 24 h 检测一次，连续检测 7 d。每个细胞系 3 个平行处理与 1 个空白对照的酶活性分别记为 S1，S2，S3 和 C，计算 S1 – C，S2 – C 和 S3 – C 的平均值（± 标准差）作为重组蛋白在待测细胞中的表达量。

1.6　重组 SEAP 蛋白在细胞中表达水平的测定

供试 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞与 AcMNPV-SEAP 的接种和抽样方法同 1.5 节所述步骤。使用 Phospha-Light System（Applied Biosystems，货号 T1017）检测样品中重组 SEAP 蛋白的活性（mU）。

1.7　简单重复序列区间（inter simple sequence repeat，ISSR）图谱分析

按照 Grasela 和 McIntosh（2003）的方法，使用 10 条 ISSR 引物，其中包括：4 条 5′端重复序列引物：ISSR1（GCTAGTGCTCACACACACACACAT），ISSR2（GATGCTGATGCACACACACACACA），ISSR3（GCACATGCAGTGTGTGTGTGTGTG），ISSR4（CATGCACATTGTGTGTGTGTGTGT）；6 条 3′端重复序列引物：ISSR5[$(GA)_8A$]，ISSR6[$(AC)_8G$]，ISSR7[$(AG)_8G$]，ISSR8[$(CA)_6AC$]，ISSR9[$(CA)_6AG$]，ISSR10[$(CA)_6GG$]。对 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞系进行 ISSR-PCR 分析。使用 EasyPure Genomic DNA Kit（北京全式金生物技术有限公司，货号 EE101-01）分别从供试细胞 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 中抽提总 DNA 作为模板。PCR 反应总体积为 25 μL，使用 2 × EasyTaq PCR Super Mix（北京全式金生物技术有限公司，货号 AS111-01）配制反应体系，其中包括 200 ng DNA 模板和 4 μmol/L 引物。ISSR-PCR 扩增程序：95℃ 3 min；30 个循环（95℃ 20 s，40℃ 20 s，72℃ 30 s）；最后 72℃ 5 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖（Biowest，货号 111760）凝胶恒压 40 V 4 h 进行电泳检测（电泳仪 Bio-Rad PowerPac Basic Power Supply，型号 164-5050）。将每个样品在电泳图上清晰的 DNA 条带标记为 1，同一位置无带和不易分辨的带记为 0，建立 1/0 矩阵，量化 PCR 扩增产物的电泳结果。统计每个引物在 2 个供试细胞系中扩增出的共有和特异性条带总数，计算共有条带占总数的百分比作为 2 个细胞系的遗传相似性指数（Nguyen *et al*.，2011）。

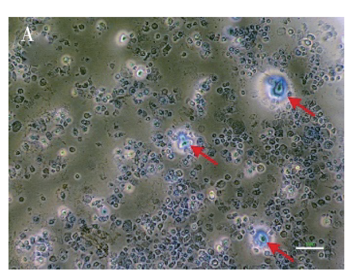
1.8　数据分析

采用单因素方差分析（one-way ANOVA）对 wt-AcMNPV 敏感性试验数据进行差异显著性分析。使用 IBM SPSS Statistics（Version 19.0.0）对两细胞系数据进行独立样本 *t* 检验（independent samples *t*-test），确定克隆株 RIRI-PX1-C24 对 3 种重组蛋白的表达水平较亲本细胞系 RIRI-PX1 是否具有显著差异（$P < 0.05$）。

2　结果

2.1　亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 对 wt-AcMNPV 的敏感性

利用免疫学原理标记 wt-AcMNPV 病毒包膜蛋白 GP64 使其显现可见蓝色标记，以示踪病毒体位置。单细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 和亲本细胞系 RIRI-PX1 感染 wt-AcMNPV 44 h 后均能产生扩散性蓝色斑点（图 1），说明供试细胞系均能被 wt-AcMNPV 侵染，且病毒在细胞内进行了复制增殖。在相同细胞密度和相同病毒接种量的情况下，RIRI-PX1-C24 细胞中产生的平均蓝斑数为 13.25 ± 5.12 个/孔，显著多于 RIRI-PX1 的 5.75 ± 3.30 个/孔（$F = 6.054$，$P = 0.049 < 0.05$），说明克隆株 RIRI-PX-C24 对 wt-AcMNPV 的敏感性较亲本细胞系 RIRI-PX1 有显著提高。



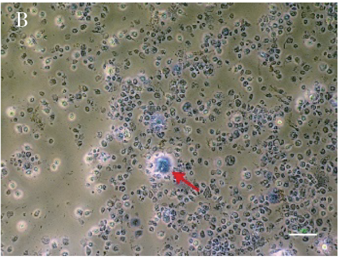


图 1　wt-AcMNPV 侵染 44 h 后克隆株 RIRI-PX1-C24（A）和亲本细胞系 RIRI-PX1（B）形成的 GP64 标记蓝斑显微形态照片

Fig. 1　Blue plaques of envelope protein GP64 marked by immunological principle in the clonal strain RIRI-PX1-C24 (A) and the parent cell line RIRI-PX1 (B) after inoculation with wt-AcMNPV for 44 h

红色箭头指向蓝色斑点 Red arrows point blue stained foci of infection. 比例尺 Scale bar = 100 μm.

2.2 重组 GFP 在亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达水平

亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 感染 AcMNPV-GFP 后 48 h 可观察到发绿色荧光的细胞,感染 5 d 后发绿色荧光的细胞数达到最大(图 2)。对受 AcMNPV-GFP 侵染的细胞系进行 Western blot 检测(图 3),发现重组 GFP 在 RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞中获得表达,GFP 分子量大小约 27 kD,与重组 GFP 分子量相符。未受重组病毒侵染的供试细胞系作为阴性对照,在 27 kD 处未发现对应条带。从 GFP 对应条带亮度发现,在细胞密度、病毒滴度以及侵染时长等试验条件均相同的情况下,GFP 在 RIRI-PX1-C24 中的表达量显著大于在 RIRI-PX1 中的。

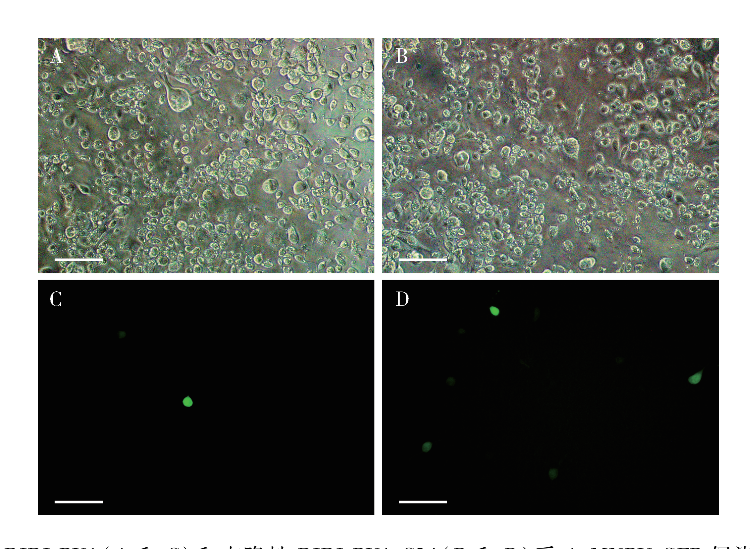


图 2 亲本细胞系 RIRI-PX1(A 和 C)和克隆株 RIRI-PX1-C24(B 和 D)受 AcMNPV-GFP 侵染 5 d 后的细胞形态

Fig. 2 Photomicrographs of the parent cell line RIRI-PX1 (A and C) and the clonal strain RIRI-PX1-C24 (B and D) infected with AcMNPV-GFP at 5 d post infection

A, B: 明场光源下细胞形态照片 Cells under normal light; C, D: 激发光下细胞形态照片 Cells emitting green fluorescent light under fluorescence microscopy; AcMNPV-GFP: 重组绿色荧光蛋白杆状病毒 Recombinant baculoviruses carrying green fluorescent protein. 图 3 和图 4 同 The same for Figs. 3 and 4. 比例尺 Scale bar = 100 μm.

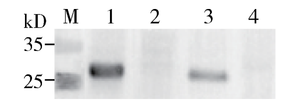


图 3 亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中重组 GFP 蛋白的 Western blotting 免疫印迹结果

Fig. 3 Western blotting analysis of recombinant GFP expressed from the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24

M: Transgen 180 bp Blue Plus Ⅳ Protein Marker (TransGen Biotech, Cat. DM131-01). 1, 3: 分别为受 AcMNPV-GFP 侵染的 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1 细胞 RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1 cells infected with AcMNPV-GFP, respectively; 2, 4: 未受 AcMNPV-GFP 侵染的 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1 细胞作为阴性对照 RIRI-PX1-C24 and RIRI-PX1 cells uninfected with AcMNPV-GFP as negative controls, respectively.

统计亲本细胞系 RIRI-PX1 及其克隆株 RIRI-PX1-C24 随感染 AcMNPV-GFP 时间的延长,对应发绿色荧光细胞数的变化情况(图 4)。发现 RIRI-PX1-C24 在接种病毒 48 h 后可检测到发绿色荧光细胞,绿色荧光细胞数量不随感染时间的延长而持续增加,120 h 后达到最大值,之后的 144 h 和 168 h 绿色荧光细胞数量逐渐减少。亲本细胞系 RIRI-PX1 中的绿色荧光细胞数量较少,仅在接种病毒后 72, 96 和 120 h 检测到极少细胞显现绿色荧光。对 3 个时段的数值进行单因素方差分析(one-way ANOVA)发现它们无显著差异($F = 0.200$, $P = 0.824 > 0.05$)。对 2 个供试细胞系的数据进行独立样本 t 检验(independent samples t-test),证实重组 GFP 在克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达量较亲本细胞系 RIRI-PX1 有显著提高($t = -6.183$, $df = 2.616$, $P = 0.013 < 0.05$)。

2.3 重组 β-半乳糖苷酶蛋白在亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达

比较重组 β-半乳糖苷酶蛋白在亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达量的变化情况(图 5),发现 2 种细胞均能被 AcMNPV-Gal 侵染并表达 β-半乳糖苷酶,β-半乳糖苷酶的表达量

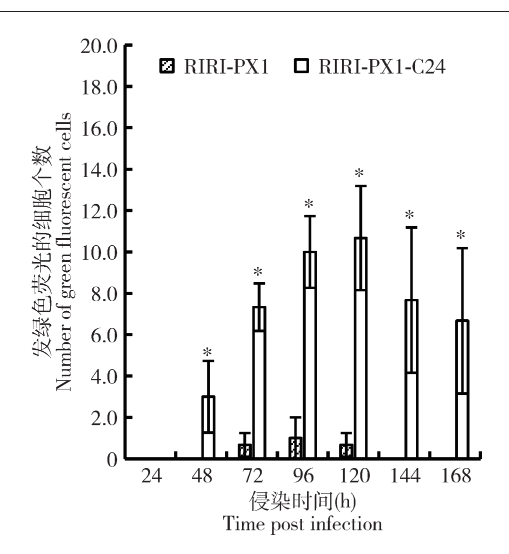


图 4　亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中发绿色荧光的细胞数目随侵染 AcMNPV-GFP 时间而变化的直方图

Fig. 4　Histogram depicting the presence of GFP expressed in the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24 at various time points after inoculation with AcMNPV-GFP

图中数据为平均值 ± 标准差；星号示同一时间两细胞系之间差异显著（$P < 0.05$，独立样本 t 检验）。Data in the figure are mean ± *SD*, and the asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$, independent samples t-test) between the two cell strains at the same time.

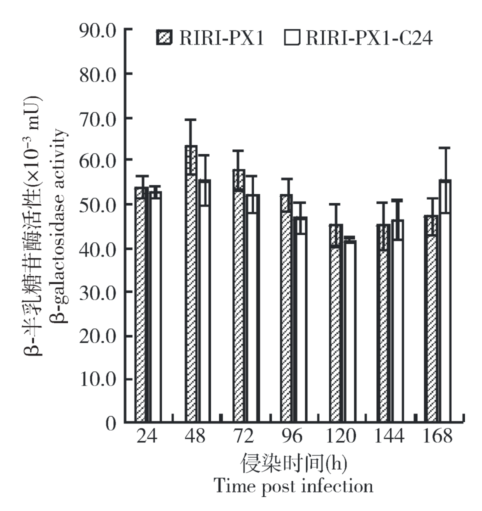


图 5　亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中重组 β-半乳糖苷酶活性随侵染 AcMNPV-Gal 时间而变化的直方图

Fig. 5　Histogram depicting the change of recombinant β-galactosidase activity in the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24 at various time points after inoculation with AcMNPV-Gal

AcMNPV-Gal：重组 β-半乳糖苷酶杆状病毒 Recombinant baculoviruse carrying β-galactosidase.

随病毒侵染时间的延长而呈现波浪形变化趋势。48 h 后 β-半乳糖苷酶在 RIRI-PX1 中的表达量达到最高[酶活性$(63.423 \pm 6.310) \times 10^{-3}$ mU]，RIRI-PX1-C24 中在 168 h 后达到最高值[$(55.639 \pm 7.666) \times 10^{-3}$ mU]。独立样本 t 检验结果发现，重组 β-半乳糖苷酶蛋白在克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达量较亲本细胞系 RIRI-PX1 没有显著提高（$t = -0.90$，$df = 40$，$P = 0.372 > 0.05$）。

2.4　重组 SEAP 蛋白在亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达

重组 SEAP 蛋白的表达量随 AcMNPV-SEAP 侵染时间的延长而逐渐增大（图 6），96 h 后亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中 SEAP 的酶活性均达到最高值，之后逐渐降低。t 检验结果显示，重组 SEAP 在克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达量较亲本细胞系 RIRI-PX1 也没有显著提高（$t = -0.634$，$df = 40$，$P = 0.530 > 0.05$）。

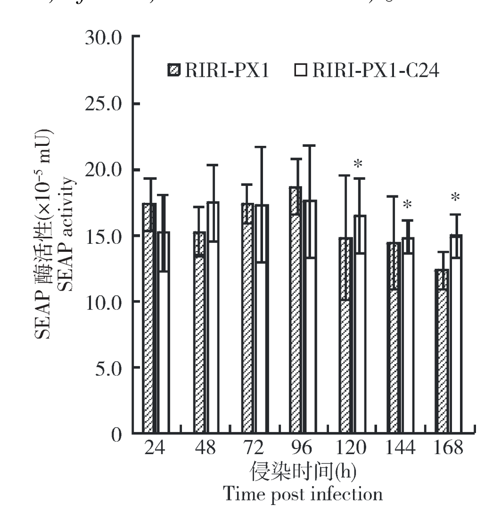


图 6　亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 中重组 SEAP 酶活性随侵染 AcMNPV-SEAP 时间而变化的直方图

Fig. 6　Histogram depicting the change of recombinant SEAP activity in the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24 at various time points after inoculation with AcMNPV- SEAP

AcMNPV-SEAP：重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒 Recombinant baculoviruse carrying secreted alkaline phosphatase. 图中数据为平均值 ± 标准差；星号示同一时间两细胞系之间差异显著（$P < 0.05$，独立样本 t 检验）。Data in the figure are mean ± *SD*, and the asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$, independent samples t-test) between the two cell strains at the same time.

2.5　RIRI-PX1 和 RIRI-PX1-C24 细胞系来源的分子鉴定

使用 10 条 ISSR 引物检测 RIRI-PX1-C24 的多

态性以区分亲本细胞系 RIRI-PX1 与其克隆株 RIRI-PX1-C24。从图 7 电泳结果发现 10 条引物均能扩增出 PCR 条带,每条引物产生的条带数从 2 ~ 7 条不等,大小从 200 ~ 1 500 bp 不等。计算 2 个供试细胞系的遗传相似性指数获得表 1 结果。2 个供试细胞系使用 ISSR1, ISSR5, ISSR6 及 ISSR9 这 4 条引物扩增出的条带存在差别,其遗传相似性均小于 100%,特别是 ISSR5 对应条带其遗传相似性为 0,说明亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 在基因型上是有差异的。

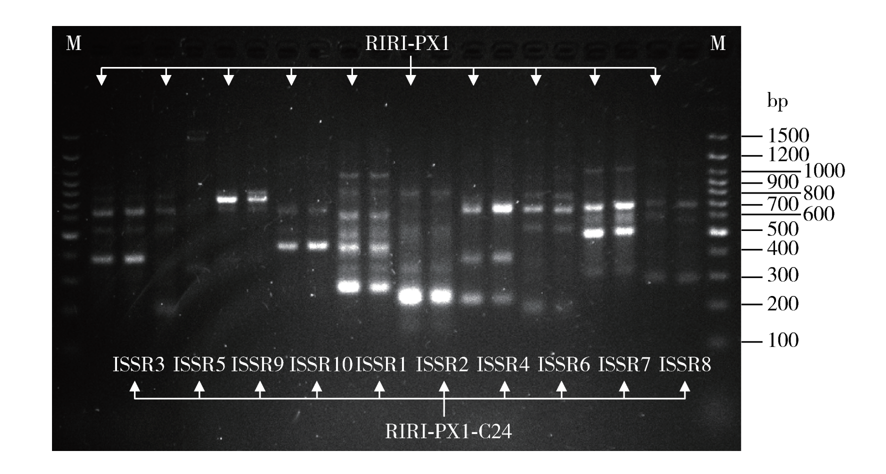


图 7 亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 的 ISSR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 7 Gel electrophoresis pattern of ISSR amplification products of the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24

ISSR1 – ISSR10: PCR 引物 PCR primers; M: 全式金 100 bp Plus DNA Ladder (TransGen Biotech, Cat. BM311).

表 1 亲本细胞系 RIRI-PX1 和克隆株 RIRI-PX1-C24 基于 ISSR 扩增产物的遗传相似性指数

Table 1 Genetic similarity index of the parent cell line RIRI-PX1 and the clonal strain RIRI-PX1-C24 based on ISSR amplification products

引物 Primers	总条带数 Number of bands	共有条带数 Number of common bands	遗传相似性指数(%) Genetic similarity index
ISSR1	6	5	83.33
ISSR2	4	4	100.00
ISSR3	3	3	100.00
ISSR4	3	3	100.00
ISSR5	7	0	0.00
ISSR6	4	3	75.00
ISSR7	5	5	100.00
ISSR8	3	3	100.00
ISSR9	2	1	50.00
ISSR10	2	2	100.00

3 讨论

柑橘凤蝶单细胞克隆株 RIRI-PX1-C24 与亲本细胞系 RIRI-PX1 具有相同的遗传背景,但两者的基因型特性和对病毒的敏感性仍有明显差异。比较 3 种重组蛋白在 RIRI-PX1-C24 和 RIRI-PX1 中的表达水平发现,胞内表达的重组 GFP 在克隆株 RIRI-PX1-C24 中的表达水平显著高于在亲本细胞系 RIRI-PX1 中的表达水平,但 RIRI-PX1-C24 中分泌型蛋白 β-半乳糖苷酶和 SEAP 的表达水平较亲本细胞系中并无显著提高。

与常规的通过显微观察来分辨病变细胞的方法相比,本研究中采用共轭双抗标记 AcMNPV GP64 蛋白并使其显色的方法,可更加直观地标示出受病毒感染的区域和规模,避免了人为主观判断所导致的误差,特别适合应用于重组 AcMNPV 对宿主细胞侵染力研究。由于重组 AcMNPV 中的多角体蛋白基因(polyhedron gene)被外源基因所替代,导致重组 AcMNPV 无法在宿主中形成多角体包被的包涵体病毒,通过显微观察很难区别受侵染的病变细胞个体,利用本研究中使用的免疫标记法可以有效克服这个问题。

柑橘凤蝶细胞均能够表达供试的 3 种重组蛋白,但与常用的宿主细胞系如 Sf9 相比[相同试验条件下,Sf9 细胞分别接种了 3 种重组杆状病毒,96 h 后检测到重组 GFP 在 Sf9 中的表达量最高值为 1 260.67 ± 88.64 个/孔,重组 β-半乳糖苷酶的酶活性最高值为 $(706.051 \pm 10.612) \times 10^{-3}$ mU,重组 SEAP 的酶活性最高值为(32 656.700 ± 24 486.79) ×

10^{-5} mU(未发表数据)],其表达水平仍较低。我们推测造成这种结果的主要原因是柑橘凤蝶并不是 AcMNPV 的天然宿主,受重组病毒侵染的细胞数量较 Sf9 低。自然界中杆状病毒具有高度的宿主特异性,一种病毒往往只能感染亲缘性较近的少数几种昆虫。但这种宿主特异性是相对的,每种病毒有一个原始宿主,但也往往可以感染若干替代宿主(刘丽华, 2006)。AcMNPV 的宿主域较广能感染多种鳞翅目昆虫。正是这个原因使 AcMNPV 成为 BEVS 最常用的载体而被用于构建重组病毒,在其敏感型宿主细胞内能够大量表达外源蛋白。由此可见,重组病毒表达载体的选择是影响外源蛋白表达水平的重要因素。目前,一个可能的改进方法是通过对 AcMNPV 宿主识别域基因的改造扩大宿主范围从而提高受侵染细胞数量,最终获得更高的外源蛋白表达量(Zheng *et al*., 2005)。另一方面,克隆株 RIRI-PX1-C24 由单细胞分裂增殖获得,其生物学特性与亲本细胞系 RIRI-PX1 确实存在显著差异。ISSR 指纹图谱结果也证实 RIRI-PX1-C24 与 RIRI-PX1 在分子水平也存在一定差异,这可能提高了宿主细胞对重组 AcMNPV 的吸收,导致重组 GFP 的表达量增高。柑橘凤蝶细胞系及其克隆株能否通过对重组病毒或者宿主细胞系的改造提高外源基因表达水平还有待进一步研究。

参考文献 (References)

Durocher Y, Butler M, 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotech*., 20(6): 700-707.

Granados RR, Li GX, Blissard GW, 2007. Insect cell culture and biotechnology. *Virol. Sin*., 22(2): 83-93.

Granados RR, Li GX, Derksen ACG, McKenna KA, 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol*., 64(3): 260-266.

Grasela JJ, McIntosh AH, 2003. Application of inter-simple sequence repeats to insect cell lines: identification at the clonal and tissue-specific level. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 39(8-9): 353-363.

Jarvis DL, 2003. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*, 310(1): 1-7.

Jarvis DL, Finn EE, 1995. Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology*, 212(2): 500-511.

Liu LH, 2006. Research progress of baculovirus host domain. *China Sericul*., 27(2): 95-98. [刘丽华, 2006. 杆状病毒宿主域的研究进展. 中国蚕业, 27(2): 95-98]

Liu ZG, Ding WF, Xie SC, Sun N, Zhang X, Li X, Feng Y, 2018. Establishment and characterization of cell clones from the Papilio cell line RIRI-PaDe-3 by a high-efficiency clonal method. *Cytotechnology*, 70: 1235-1245.

Marchal I, Jarvis DL, Cacan R, Verbert A, 2001. Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol. Chem*., 382(2): 151-159.

Mitsuhashi J, 2002. Invertebrate Tissue Culture Methods. Springer Verlag, Tokyo. 307-400.

Murhammer DW, 2016. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. 3rd ed. Humana Press Inc., New Jersey. 119-130.

Nguyen Q, Qi YM, Wu Y, Chan LCL, Nielsen LK, Reid S, 2011. *In vitro* production of *Helicoverpa* baculovirus biopesticides - Automated selection of insect cell clones for manufacturing and systems biology studies. *J. Virol. Methods*, 175(2): 197-205.

Palomares LA, Joosten CE, Hughes PR, Granados RR, Shuler ML, 2003. Novel insect cell line capable of complex *N*-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnol. Prog*., 19(1): 185-192.

Pan MH, Cai XJ, Liu M, Lv J, Tang H, Tan J, Lu C, 2010. Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell*, 42(1): 42-46.

Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT, 2012. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr. Purif*., 84(1): 147-153.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P, 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*, 13(4): 213-217.

Zhang H, Zhang YA, Qin QL, Wang YZ, Qu LJ, Li X, Miao L, Yin ZX, Zhang AJ, Wen FY, 2007. Advances in establishment of insect cell lines. *Acta Entomol. Sin*., 50(8): 834-839. [张寰, 张永安, 秦启联, 王玉珠, 曲良建, 李瑄, 苗麟, 殷珍仙, 张爱君, 温发园, 2007. 昆虫细胞系的培养和建立技术. 昆虫学报, 50(8): 834-839]

Zhang X, Feng Y, Ding WF, Chen XM, Wang CY, Ma T, 2011. Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 47(4): 327-332.

Zhang X, Feng Y, Ding WF, Chen XM, Wang CY, Ma T, 2012. Characterization of a new insect cell line that is derived from the neonate larvae of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and its susceptibility to AcNPV. *Tissue Cell*, 44(3): 137-142.

Zheng GL, Li CY, Li GX, Wang P, Granados RR, 2005. Construction and characteristics of a transformed lepidopteran cell clone expressing baculovirus p35. *Chin. Sci. Bull*., 50(23): 2728-2732.

(责任编辑：马丽萍)